

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1931

THÈSE

N° 22

POUR

LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(MENTION MÉDECINE)

PAR

Ladislav GRÜNBERG

Né le 18 décembre 1907, à Csepreg (Hongrie)

Contribution à l'Étude

du

Bactériophage antityphique

Président : M. A. LEMIERRE, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1931

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1934

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION MÉDECINE)

PAR

Ladislav GRÜNBERG

Né le 18 décembre 1907, à Csepreg (Hongrie)

Contribution à l'Étude
du

Bactériophage antityphique

Président : M. A. LEMIERRE, *Professeur*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1934

DOYEN... M. BALTHAZARD

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie	ROUVIERE.
A anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale . .	GRÉGOIRE.
Physiologie	BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CLERC.
Pathologie chirurgicale	LENORMANT.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MÉNÉTRIER.
Pathologie expérimentale et comparée	RATHERY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET.
Clinique médicale	CARNOT.
	BEZANÇON.
	ACHARD.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	TEISSIER.
Clinique chirurgicale	DELbet.
	CUNÉO.
	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	LEGUEU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	Léon BERNARD.
Professeur sans chaire	MAUGLAIRE.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

ALAJOUANINE. Neurologie et Psychiatrie.
 N. Physiologie.
 AUBERTIN. . . Pathologie médicale.
 BÉNARD (H.). Pathologie médicale.
 BROCC . . . Pathologie chirurgicale.
 BRULÉ. . . . Pathologie médicale.
 CADENAT . . Pathologie chirurgicale.
 CATHALA . . Pathologie médicale.
 CHABROL . . Pathologie médicale.
 CHEVALLIER. Pathologie médicale.
 DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie chirurgicale.
 DOGNON. . . Physique.
 DONZELOT . . Pathologie médicale.
 ÉCALLE . . . Obstétrique.
 FEY Urologie.
 GARNIER. . . Pathologie expérimentale.
 GASTINEL . . Bactériologie.
 GATELLIER . . Pathologie chirurgicale.
 GIROUD . . . Histologie.
 HARVIER. . . Pathologie médicale.
 HAZARD . . . Pharmacologie
 HOVELACQUE Anatomie.
 HUGUENIN. . Anatomie pathologique.
 HUTINEL. . . Pathologie médicale.
 JOANNON. . . Hygiène.

MM.

LABBÉ (Henri) Chimie biologique.
 LAROCHE (G.) Pathologie médicale.
 LEMAITRE. . Oto-rhino-laryngologie.
 LEVEUF . . . Pathologie chirurgicale
 LÉVY-VALENSI. Neuro-psychiatrie
 LIAN. Pathologie médicale.
 MILLOT . . . Histologie.
 MONDOR. . . Pathologie chirurgicale.
 MOREAU. . . Pathologie médicale.
 MOULONGUET. Pathologie chirurgicale.
 MOURE. . . . Pathologie chirurgicale.
 MULON. . . . Histologie.
 OBERLING. . Anatomie pathologique.
 OLIVIER. . . Anatomie.
 PIÉDELIÈVRE Médecine légale.
 PORTES . . . Obstétrique.
 QUÉNU. . . . Pathologie chirurgicale.
 RICHT. . . . Physiologie.
 SANNIÉ . . . Chimie biologique.
 SÉZARY . . . Dermatologie et Syphiligraphie.
 VALLERY-RADOT
 (Pasteur) . . Pathologie médicale.
 VAUDESCAL. Obstétrique
 VELTER . . . Ophtalmologie.
 VERNE. . . . Histologie.
 VIGNES. . . . Obstétrique.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

BUSQUET . . Pharmacologie.
 GUÉNIOT. . . Obstétrique.
 LEQUEUX . . Obstétrique.
 LEROUX. . . Anatomie pathologique.

MM.

NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie
 RETTERER. . Histologie.
 ZIMMERN. . . Physique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.

ABRAMI. . . Clinique médicale.
CHIRAY. . . Clinique médicale.
DEBRÉ. . . Clinique médicale.
DUVOIR. . . Clinique médicale.
FIESSINGER. Clinique médicale.
LAIGNEL-LAVASTINE. Clinique médicale.
BASSET. . . Clinique chirurgicale.
CHEVASSU. . Clinique chirurgicale.

MM.

HEITZ-BOYER. Clinique chirurgicale.
MATHIEU. . . Clinique chirurgicale.
MOCQUOT. . . Clinique chirurgicale.
PROUST. . . Clinique chirurgicale.
SCHWARTZ. . Clinique chirurgicale.
LE LORIER. . Clinique chirurgicale.
LEVY-SOLAL. Clinique obstétricale.
METZGER. . . Clinique obstétricale.

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. MAUCLAIRE, professeur sans chaire	{	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.
FREY		Stomatologie.
CHAILLEY-BERT.		Education physique.
LEDOUX-LEBARD.		Radiologie clinique
WEIL-HALLÉ		Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PÈRE ET A MA MERE

A MONSIEUR ANDRÉ LEMIERRE

Professeur de Bactériologie
à la Faculté de Médecine de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui a bien voulu accepter la
présidence de notre thèse.*

A MONSIEUR ANDRÉ PHILIBERT

Professeur agrégé
Chef des Travaux Pratiques de Bactériologie
à la Faculté de Médecine de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui nous a dirigés dans nos
travaux.*

Contribution à l'Etude DU Bactériophage antityphique

INTRODUCTION

La bactériophagie ou « phénomène de d'HERELLE » a été découverte en 1916 ou du moins c'est à cette époque qu'elle a reçu l'interprétation que d'HERELLE n'a cessé de développer depuis. Dans sa forme la plus typique elle consiste dans une dissolution d'une culture bactérienne par un « principe lysant ». Quant à la nature de ce dernier, les hypothèses ne manquent pas. D'après d'HERELLE, il s'agit d'un virus filtrant, d'un être vivant. Il en possède les caractères, on y retrouve les critères de la vie : il présente la faculté de la reproduction et la variabilité. Certains auteurs n'acceptent pas cette manière de voir. Les cadres de cette thèse et nos connaissances imparfaites ne nous permettent pas d'entrer dans une discussion sur la nature du Bactériophage. Nous avons exposé d'une façon schématique la conception de d'HERELLE, car nous croyons que c'est elle qu'adoptent le plus grand nombre de bactériologues.

Quoi qu'il en soit, le phénomène de bactériophagie a donné lieu à de nombreuses recherches et d'HERELLE en a cité près de 700 dans son livre qu'il a publié en 1926. Depuis, ce nombre n'a fait que croître.

Il y a trois ans nous avons pris connaissance pour la première fois de l'existence du bactériophage. La question nous a intéressés dès le premier moment. Nous avons désiré nous en occuper plus profondément. Un article de M. RAIGA dans la *Presse Médicale* sur la thérapeutique des furoncles et anthrax par le Bactériophage nous a montré l'ampleur des horizons nouveaux qui s'ouvrent dans la science médicale par l'étude du Bactériophage. Tandis que les controverses continuent sur la nature du Bactériophage, on enregistre déjà des résultats positifs par la « phagothérapie ».

Nous avons désiré consacrer notre thèse à l'étude du Bactériophage. Quelle partie choisir dans cette science si rapidement développée ? Nous avons voulu nous occuper d'une maladie générale et nous avons pensé d'abord aux septicémies staphylococciques. L'étude du Bactériophage dans cette maladie aurait été très difficile, en raison de la rareté de cette affection. Elle aurait présenté un grand avantage : on possède des Bactériophages très virulents pour toutes les races de staphylocoques. Finalement nous nous sommes arrêtés à l'étude du Bactériophage virulent pour le bacille typhique. A l'heure actuelle, nous croyons qu'on ne possède pas de

bactériophages très virulents pour toutes les souches de Bacilles d'EBERTH. C'est un inconvénient. Par contre, la fièvre typhoïde est très fréquente, ce qui pourra faciliter les recherches.

Nous sommes allés trouver M. le Professeur agrégé PHILIBERT pour lui demander de bien vouloir diriger nos recherches qui devront constituer le sujet de notre thèse. Il nous a accueillis avec la bienveillance qui lui est connue. Il nous a expliqué la technique de ces recherches, donné le matériel nécessaire dans les Laboratoires de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Paris et dirigé nos travaux. Nous ne saurions le remercier suffisamment de nous avoir guidés d'une manière efficace avec sa grande expérience.

HISTORIQUE DU BACTÉRIOPHAGE VIRULENT POUR LE BACILLE TYPHIQUE

Nous n'avons pas la prétention d'exposer l'histoire complète du Bactériophage antityphique et de citer tous les articles qui s'occupent de cette question. Il faudra pour cela une thèse beaucoup plus importante et une connaissance linguistique bien plus étendue que la nôtre. Nous essayerons de donner les étapes les plus saillantes dans la connaissance du Bactériophage antityphique dans les lignes qui suivent.

Le premier Bactériophage virulent pour le bacille typhique a été isolé par d'HERELLE. Sa note, concernant cette découverte, a été présentée par Roux à la séance du 24 mars 1919 de l'Académie des Sciences. Il a suivi 28 cas de fièvre typhoïde, dont 14 d'une façon très minutieuse ; chez ces derniers il a recherché journellement le Bactériophage dans les fèces, en utilisant la technique habituelle. Ces 28 malades ont guéri et dans tous les cas l'auteur a trouvé un Bactériophage virulent pour le Bacille typhique (ou paratyphique) isolé au cours de la maladie. Il est très important d'insister sur le fait, que le Bactériophage isolé peut être sans aucune action sur un

Bacille d'EBERTH du laboratoire, tandis qu'il est doué d'une virulence remarquable pour un Bacille d'EBERTH isolé du même organisme malade. Ce comportement traduit tout simplement le fait que les Bacilles typhiques forment une espèce hétérogène ; les souches différentes ont des propriétés un peu particulières.

Chez l'homme sain, il existe normalement un microbe bactériophage (1) qui vit aux dépens du *Bactérium coli*. Au début d'une fièvre typhoïde on le retrouve sans modifications.

Plus tard, au cours du second septénaire on observe une exaltation de virulence pour le colibacille qui atteint très rapidement une grande intensité. L'activité se maintient pour ce bacille durant toute la maladie et ne cesse de se manifester que dans le courant de la convalescence. Cette exaltation de virulence pour le colibacille débute toujours, comme nous venons de l'indiquer, au cours du second septénaire.

L'époque d'apparition de la virulence pour le Bacille d'EBERTH varie grandement suivant la gravité de la maladie. (2) Nous citons textuellement le compte-rendu de la séance de l'Académie des Sciences :

« Dans les cas de gravité faible ou moyenne, l'activité du microbe bactériophage s'est manifestée
« pour le Bacille typhique avant la fin du second

¹ 1. D'Herelle, *Le Bactériophage et son comportement*, p. 378.

² 2. D'Herelle, séance du 24 mars 1919 de l'Académie des Sciences.

« septénaire et a cessé au début ou au cours de la
« convalescence ; l'activité a donc été parallèle pour
« le bacille pathogène et pour le Bactérium coli. Dans
« les cas graves, l'activité, pour le Bacille typhique,
« n'a commencé à se manifester d'une manière éner-
« gique que vers le début de l'amélioration définitive ;
« elle a persisté plus ou moins longtemps, dans
« certains cas, jusque vers le milieu de la convales-
« cence. Dans les formes à rechutes et à recrudes-
« cences, la virulence du microbe bactériophage
« ne s'est exaltée pour le bacille pathogène, d'une
« manière marquée, qu'au déclin de la rechute ou
« de la dernière recrudescence ; l'activité s'est main-
« tenue jusqu'à la convalescence. Dans presque tous
« les cas, j'ai noté une activité faible et momentanée
« au déclin de chaque défervescence. »

La guérison a toujours coïncidé avec l'exaltation de la virulence du Bactériophage contenu dans les fécès pour l'agent pathogène.

Mais antérieurement à cette note, d'HERELLE signale la présence d'un « microbe anti » chez les convalescents de fièvre typhoïde. Dans sa Note « Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques », Note présentée à la séance du 10 septembre 1917 à l'Académie des Sciences par Roux, il déclare avoir réussi à isoler un microbe filtrant doué de propriétés lytiques nettes vis-à-vis du bacille para-typhique A, mais toutefois moins marquées que chez le microbe anti-Shiga. Ces isolements ont été faits une fois dans les selles

d'un convalescent, dans l'autre cas dans les urines.

A. BECKERICH et P. HAUDUROY (1) ont trouvé le Bactériophage dans des échantillons de terre, dans l'eau de la rivière Ill, dans l'eau du Rhin filtrée par du sable. L'activité initiale de ces souches de Bactériophage était variable mais d'habitude elle était moyenne.

Les mêmes auteurs (2) constatent la présence d'un Bactériophage actif pour le Bacille d'EBERTH dans le sang au cours d'une fièvre typhoïde, ou mieux, au moment de la défervescence. Leurs recherches ont porté sur 15 cas. Dans les hémocultures négatives faites au moment de la défervescence de la fièvre typhoïde, ils trouvent un Bactériophage très actif même pour les bacilles typhiques de collection. Dans les hémocultures positives faites au moment de la défervescence, il existe bien un Bactériophage antityphique, mais beaucoup moins actif que dans les cas précédents. Ils ont examiné en outre le sang de 9 individus sains, mais à aucun moment ils n'ont trouvé de Bactériophage antityphique.

JANET ANDERSON CADWELL (3) trouve que les eaux de rivières et de ports polluées par les eaux d'égoûts contiennent toujours du Bactériophage actif vis-à-vis du Bacille typhique, du Bacille dysentérique, du

1. Société de Biologie, Séance du 13 janvier 1922.

2. Société de Biologie, séance du 27 octobre 1923.

3. *Sewage filtrate as a source of Bacteriophage Journ. Inf. Dis.*, t. XL, mai 1927.

Colibacille et de beaucoup d'autres espèces microbiennes Gram négatives. Ce Bactériophage se montre particulièrement actif pour le Colibacille. Il le propose pour le traitement des coluries.

NAKASHIMA (1) trouve le Bactériophage anticoli dans l'eau d'égoût de ville. Nous mentionnons ici son travail, car comme nous allons exposer plus loin, nous avons trouvé un Bactériophage virulent pour le Colibacille et le Bacille d'EBERTH dans l'eau d'égoût de la ville de Paris.

Parallèlement à ces travaux, en 1922, commence une nouvelle période dans l'étude du Bactériophage antityphique : la période des essais thérapeutiques. Inspiré par les résultats obtenus par d'HERELLE dans la typhose aviaire, BECKERICH et HAUDUROY (2) appliquent pour la première fois dans la fièvre typhoïde le Bactériophage dans un but thérapeutique. Les résultats sont très variables. Les cas sont d'ailleurs peu comparables. Ils ont traité des formes graves et moyennes. Le moment d'administration varie du 9^e au 23^e jour. La voie d'administration était buccale et sous-cutanée. Dans la moitié des cas une guérison rapide et durable fut le résultat. Depuis, un grand nombre d'auteurs se sont occupés de la question, rencontrant des succès et des échecs, sans savoir donner la raison des insuccès.

1. *Beitrag zum Vorkommen und Verhalten des bacteriophagen Lysins in Abwässern (Zentralblatt f. Bakt. 1, t. XCIV, 1925)*

2. C. R. Soc. Biol., 1922, 86, 881.

EXPOSÉ DE NOS RECHERCHES.

Notre thèse n'est qu'une toute première étape des travaux que nous nous proposons d'effectuer. Comme nous disions plus haut, le nombre de guérisons obtenues par la thérapeutique bactériophagique est restreint par rapport aux échecs. Nous voulions rechercher les meilleures conditions pour l'action du Bactériophage, car nous sommes convaincus que ce dernier constituera la thérapeutique spécifique de la fièvre typhoïde. Pour cela nous devons suivre le plan suivant : trouver une souche de Bactériophage très actif pour le Bacille d'EBERTH ; essayer son action dans des cas authentiques de fièvre typhoïde. C'est un travail très long et les circonstances nous ont empêchés de le réaliser. M. PHILIBERT nous a conseillé, comme nous ne possédions pas de malades atteints de fièvre typhoïde, de rechercher en attendant le Bactériophage antityphique dans la nature et chez des sujets sains ou présentant d'autres affections. C'est ce que nous avons fait et qui constitue le sujet de notre thèse.

Nous nous sommes efforcés de suivre la technique classique indiquée par d'HERELLE dans nos expériences. Nous avons utilisé pour les filtrations

des bougies CHAMBERLAND, généralement le n° 5. La bougie était montée dans un tube à tubulure latérale au moyen d'un bouchon en caoutchouc. La tubulure était reliée à un appareil faisant le vide. Comme milieu de culture, nous avons employé d'habitude l'eau peptonée et la gélose; mais naturellement quand ils'agissait de microbes spéciaux ou d'identification de microbes, nous nous sommes servis d'autres milieux.

Recherche du Bactériophage dans l'eau stagnante.

Nous voulons rechercher le Bactériophage antityphique dans la nature et pour cela nous prélevons dans un tube à essai de l'eau stagnante que nous avons trouvée aux environs de Paris, dans un parc (Saint-Cloud). Nous y ajoutons de l'eau peptonée et le tube à essai est mis à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

Quand nous le retirons de l'étuve, son contenu est trouble mais ne nécessite pas de filtration grossière sur terre d'infusoires. Nous le filtrons d'emblée sur une bougie CHAMBERLAND n° 5. Pour nous assurer de la stérilité du filtrat, nous l'ensemencions sur un tube de bouillon qui est mis à l'étuve pendant 24 heures, tandis que le filtrat est gardé à la température du laboratoire sur notre table. Le lendemain nous constatons que le tube de bouillon ensemencé

par le filtrat, ainsi que le filtrat pur, est resté limpide.

Nous voulons mettre en évidence un bactériophage antityphique dans notre filtrat. Nous préparons une culture de Bacilles d'EBERTH : nous ensemençons un tube d'eau peptonée par une souche de Bacilles d'EBERTH de collection. 18 heures plus tard nous divisons la culture obtenue en deux et nous ajoutons à l'un des tubes 15 gouttes du filtrat, l'autre tube reste témoin. Ils sont placés à l'étuve. Après 24 heures nous constatons qu'il n'y a pas de lyse dans le tube qui contient du filtrat : les deux tubes sont également louches.

En supposant que le filtrat peut contenir un Bactériophage de faible virulence pour le Bacille typhique, nous essayons s'il empêche le développement du bacille. Deux tubes d'eau peptonée sont ensemencés avec le Bacille d'EBERTH et l'un d'eux reçoit encore 15 gouttes du filtrat. Après 4 heures d'étuve les tubes sont également troubles et restent troubles plus tard aussi. Ainsi donc le filtrat ne possède ni une action lysante, ni une action empêchante pour le Bacille Typhique.

Nous voulons voir si le filtrat ne contient pas, par hasard, un Bactériophage virulent vis-à-vis du Colibacille. Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec une souche de Colibacilles qui s'est montrée sensible à l'action d'un Bactériophage du laboratoire. Nous ajoutons à l'un des tubes la quantité de filtrat qui nous est restée et nous plaçons les tubes à l'étuve. Le lendemain, les deux tubes con-

tiennent une culture, il n'y a pas d'action empêchante pour la Colibacille.

Nous ne voulons pas laisser passer inaperçu un Bactériophage même de très faible virulence pour le Bacille d'EBERTH. Nous reprenons le tube dans lequel nous avons voulu rechercher l'action empêchante du Bactériophage pour le Bacille d'EBERTH. Il contient actuellement une culture de bacilles typhiques que nous avons obtenue en ajoutant à de l'eau peptonée du filtrat et nous l'avons inoculée de Bacilles typhiques. Nous étalons sur gélose inclinée quelques gouttes de cette culture et nous la mettons à l'étuve. 24 heures plus tard, nous examinons le tube : il a donné une culture de Bacilles d'EBERTH normale, nous ne voyons pas de plages circulaires sans culture de bacilles, ce qui serait le signe de la présence d'un Bactériophage antityphique peu virulent.

Nous terminons notre première expérience et nous pouvons dire que l'échantillon d'eau stagnante que nous avons examinée ne contient pas de Bactériophage actif pour le Bacille d'EBERTH, ni pour le *Bactérium coli*.

Recherche du Bactériophage antityphique dans la terre.

Nous avons prélevé de la terre dans le jardin de Saint-Cloud, nous la mettons dans un tube à essai,

nous y ajoutons de l'eau peptonée et le plaçons à l'étuve à 37°, où il reste pendant 24 heures. Au bout de ce temps nous le trouvons très trouble, le liquide ne se prête pas d'emblée au filtrage sur bougie, il en provoquerait la colmatation. Nous le filtrons d'abord sur terre d'infusoires. Un filtre en papier est placé sur un entonnoir. Nous délayons une pincée de terre d'infusoires dans un peu d'eau distillée, nous l'agitons pour qu'elle forme une suspension à peu près homogène. Puis nous la versons d'un seul coup sur l'entonnoir. L'eau décante et laisse déposer une couche de terre d'infusoires. Le filtre pour le dégrossissage du liquide est prêt. Après un filtrage sur terre d'infusoires, le liquide obtenu est filtré sur une bougie CHAMBERLAND L. 5. Pour s'assurer de la stérilité du filtrat, nous l'ensemencions sur un tube de bouillon que nous mettons à l'étuve pendant 24 heures. Le tube ensemencé reste limpide.

Pour la recherche d'un Bactériophage antityphique dans le filtrat, nous ensemencions un tube d'eau peptonée avec un Bacille d'EBERTH de collection. 18 heures plus tard, nous divisons la culture obtenue en deux tubes et à l'un d'eux nous ajoutons 15 gouttes de filtrat et nous mettons à l'étuve les deux tubes. Le lendemain nous trouvons que les deux cultures sont restées pareilles. Donc, le filtrat ne contient pas un Bactériophage antityphique assez puissant pour produire la lyse d'une culture de Bacille typhique.

Nous voulons déceler la présence d'un Bactériophage antityphique de moindre virulence par le phénomène d'empêchement. Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Bacille d'EBERTH, et à l'un des tubes nous ajoutons une quinzaine de gouttes du filtrat. Nous laissons les deux tubes à la température du laboratoire sur notre table. Le lendemain nous constatons que les deux tubes ont donné une culture également abondante et nous en concluons que le filtrat ne possède pas d'action empêchante pour le Bacille d'EBERTH.

Si notre filtrat ne produit pas la lyse d'une culture de Bacilles d'EBERTH et ne l'empêche pas de se développer, peut-être contient-il un Bactériophage actif vis-à-vis du Bactérium coli. Nous ne supposons pas que ce Bactériophage anti-colibacillaire éventuel soit très actif, aussi nous n'essayons pas de rechercher la lyse d'une culture de Colibacilles. Nous voulons savoir, si le filtrat n'a pas d'action empêchante sur une culture de Colibacilles. Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Colibacille et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes de filtrat. Les deux tubes sont mis à l'étuve, 24 heures plus tard les deux tubes ont donné des cultures pareilles.

Ces expériences n'excluent pas la présence d'un Bactériophage très peu virulent et pour nous en assurer, nous allons faire des cultures sur gélose. Nous reprenons le tube dans lequel nous voulions rechercher l'action empêchante pour le Bacille typhi-

que. Nous étalons quelques gouttes de cette culture sur un tube de gélose et nous préparons un tube témoin avec une culture bactérienne normale. Les tubes sont placés à l'étuve. Dans 24 heures les surfaces de gélose sont couvertes de culture normale de Bacilles d'EBERTH, sans plage. Le filtrat ne contient même pas de Bactériophage antityphique très peu virulent.

Nous faisons la même expérience pour la recherche du Bactériophage anticolibacillaire. Nous étalons sur gélose la culture de Colibacilles où nous avons ajouté du filtrat et nous préparons un tube témoin avec une culture bacillaire normale. Les tubes de gélose sont placés à l'étuve pour 24 heures. Ils donnent des cultures absolument normales, sans plages.

L'échantillon de terre de jardin que nous avons examiné ne contient donc pas de Bactériophage virulent pour le Bacille typhique et le Bactérium coli.

A. BECKERICH et P. HAUDUROY(1) ont déjà trouvé le Bactériophage antityphique dans la terre de jardin.

Recherche du Bactériophage antityphique dans l'eau d'égout.

Suivant la conception de d'HERELLE, les Bactériophages pullulent surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux où ils trouvent les meil-

1. Société de Biologie, séance du 13 janvier 1922.

leures conditions d'existence et vivent aux dépens des microbes intestinaux. Il est logique de les rechercher dans les déjections ou bien dans l'eau d'égouts qui n'est qu'un mélange de déjections.

Nous sommes allés à Clichy, où se trouve les bassins de dégrossissage des eaux d'égouts de la Capitale. Ce dégrossissage est purement mécanique. L'eau que nous avons prélevée est assez claire, mais laisse tout de même un dépôt noirâtre après quelques heures. Nous nous proposons d'étudier l'eau d'égout dégrossie telle qu'elle, et d'autre part l'eau d'égout cultivée sur eau peptonée. Prenons d'abord le premier cas. Nous filtrons l'eau d'égout dégrossie, qui est presque limpide, sans aucun traitement préalable, sur bougie CHAMBERLAND L 5. Le filtrat obtenu estensemencé sur bouillon pour s'assurer de sa stérilité. Le tube de bouillon est placé à l'étuve. Après 24 heures il reste limpide, donc le filtrat est stérile.

Le Bactériophage antityphique sera recherché comme dans les cas précédents. Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Bacille d'EBERTH et nous les laissons à la température du laboratoire pendant 24 heures. A l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat et plaçons les deux tubes à l'étuve. Le lendemain les deux cultures sont pareilles, le filtrat n'a pas d'action lysante par le Bacille d'EBERTH.

A-t-il une action empêchante sur le développement de la culture du Bacille typhique ? Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Bacille

d'EBERTH et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat et nous mettons à l'étuve les deux tubes. Les bacilles poussent aussi bien dans le tube qui contient du filtrat que dans celui qui n'en contient pas. Le filtrat n'a pas d'action empêchante.

Nous étalons quelques gouttes de la culture qui a reçu du filtrat sur gélose inclinée et nous préparons un tube témoin avec une culture de Bacilles typhiques normale. Après 24 heures d'étuve nous examinons les deux tubes. Le tube sans filtrat a donné une culture en couche uniforme, tandis que celui qui a reçu du filtrat montre une culture inégale, mamelonnée, avec de petites plages comme une piqûre d'aiguille.

Le filtrat contient donc un Bactériophage peu virulent pour le Bacille typhique.

Nous voulons voir son action sur le Colibacille.

Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Colibacille et nous les laissons à la température du laboratoire pendant 24 heures. A l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat et nous plaçons les deux tubes à l'étuve. Le lendemain les deux cultures sont pareilles, le filtrat n'a pas d'action lysante pour le Colibacille.

Pour voir son action empêchante sur le Bacterium coli, nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec ce bacille et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat, puis nous mettons à l'étuve les deux tubes. Les bacilles poussent aussi bien dans le tube qui contient du filtrat que dans celui qui

n'en contient pas. Le filtrat n'a pas d'action empêchante pour le Colibacille.

Nous étalons quelques gouttes de la culture qui a reçu du filtrat sur gélose inclinée et nous préparons un tube témoin avec une culture de Colibacilles normale. Après 24 heures d'étuve nous examinons les deux tubes. Le tube sans filtrat a donné une culture normale, en couche uniforme, tandis que celui qui a reçu du filtrat est tout à fait comparable au tube de Bacilles typhiques préparé de la même manière : culture inégale, mamelonnée, avec de petites plages comme une piqure d'aiguille.

Le filtrat contient donc à côté du Bactériophage antityphique un Bactériophage virulent pour le Colibacille, ou bien une seule souche de Bactériophage à virulences multiples.

Voyons maintenant comment se comporte l'eau d'égout cultivée sur eau peptonée. Après 24 heures d'étuve nous trouvons une culture très abondante et fétide. Nous la filtrons deux fois sur terre d'infusoires puis sur bougie CHAMBERLAND L 5.

Pour connaître s'il a une action lysante pour le Bacille d'EBERTH, nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec ce bacille et nous laissons les deux tubes sur notre table à la température du laboratoire. Le lendemain nous ajoutons à l'un des tubes 15 gouttes de filtrat. Après 24 heures d'étuve, les deux tubes sont restés également louches. Le filtrat ne possède pas d'action lysante pour le Bacille d'EBERTH.

Est ce qu'il empêche le développement d'une culture de Bacilles typhiques ? Pour le savoir nous commençons deux tubes d'eau peptonée avec le bacille et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat. Les tubes sont mis à l'étuve pour 24 heures. Au bout de ce temps nous constatons que le filtrat a empêché le développement du Bacille typhique, le tube est presque limpide, tandis que l'autre tube a donné une culture normale.

Le filtrat contient donc un Bactériophage antityphique de virulence moyenne.

Un petit incident se produit : notre filtrat s'est troublé. Nous le refiltrons sur bougie CHABERLAND L5, mais préalablement nous devons y ajouter de l'eau peptonée à cause de sa petite quantité, car sans cela tout le filtrat serait absorbé par la bougie.

En somme le filtrat d'eau d'égoût qui n'a pas subi de traitement préalable, contient un Bactériophage antityphique très peu virulent, car il ne possède ni une action lysante, ni une action empêchante, il se révèle seulement par des plages sur gélose de très petites dimensions. Le filtrat d'eau d'égoût cultivé préalablement sur eau peptonée contient par contre un Bactériophage antityphique d'activité moyenne, qui empêche le développement d'une culture bacillaire.

Nous allons voir qu'est-ce qu'il va donner le tube de culture de Bacilles d'EBERTH où nous avons constaté l'action empêchante. Nous étalons quelques gouttes de cette culture sur gélose inclinée. Elle

donne une centaine de colonies microbiennes. Il y a de grosses colonies et quelques très petites. M. PHILIBERT nous conseille de les examiner au microscope. A l'état frais nous ne voyons pas de bacilles mobiles. A la coloration de Gram il est impossible de dire s'il y a des cocci ou non, car la gélose se colore en violet.

Nous voulons obtenir une lyse bactérienne qui n'a pas réussi à l'épreuve précédente. Nous préparons des cultures de 15 heures et à l'un des tubes nous ajoutons du filtrat. Les tubes sont placés à l'étuve. Le lendemain il n'y a pas de lyse, mais les bacilles développés forment un dépôt au fond du tube.

Pour étudier les bacilles qui se sont montrés résistants à l'action du Bactériophage, nous ensemençons un tube d'eau peptonée avec une colonie obtenue sur gélose inclinée. Après 24 heures d'étuve nous ne trouvons qu'une louche faible. Ceci prouve que les bacilles résistants ne se comportent pas comme des bacilles normaux. Il se peut aussi que nous ayons prélevé en même temps que les bacilles résistants, le Bactériophage qui existait autour de la colonie bactérienne.

Pour exalter la virulence du Bactériophage nous mélangeons une culture de Bacilles d'EBERTH et le filtrat à parties égales et nous étalons sur gélose inclinée. Nous préparons un tube témoin et les deux tubes sont mis à l'étuve pendant 24 heures. Le Bactériophage empêche toute culture de bacilles,

la gélose reste stérile, tandis qu'une culture normale se développe dans le tube témoin.

Nous effectuons plusieurs passages de ce Bactériophage sur bacilles typhiques dans l'eau peptonée pour le conserver et exalter sa virulence en même temps. La technique de ces passages est le suivant : inoculation d'un tube d'eau peptonée à la fois avec le bacille et le Bactériophage, mise à l'étuve pendant 24 heures, filtration sur bougie CHAMBERLAND L 5.

Parallèlement à ces recherches, nous expérimentons l'action de notre filtrat sur le Colibacille.

Deux tubes d'eau peptonée sont inoculés avec le Colibacille qui fournissent une culture abondante le lendemain. Nous ajoutons à l'un des tubes du filtrat, l'autre reste témoin. Après 24 heures d'étuve, la culture n'est pas lysée. Le filtrat ne contient pas de Bactériophages assez énergiques pour lyser le Colibacille.

Nous essayons l'action empêchante. Deux tubes d'eau peptonée sontensemencés par le Colibacille et l'un d'eux reçoit 15 gouttes de filtrat. Nous les mettons à l'étuve. Le lendemain le tube qui a reçu du filtrat est presque limpide, tandis que le tube témoin est normal. Le filtrat contient donc un Bactériophage de virulence moyenne vis-à-vis le Colibacille. Sa virulence est à peu près égale à celle qu'il possède vis-à-vis du Bacille typhique.

Nous voulons obtenir des plages sur gélose avec le Bactériophage anticoli. Un mélange de culture de

Colibacilles sur eau peptonée et de filtrat à parties égales est étalé sur gélose inclinée. Nous préparons un tube témoin. Après 24 heures d'étuve, le tube où est ajouté le Bactériophage reste stérile, l'autre tube donne une culture normale.

Nous effectuons quelques passages de ce Bactériophage sur des cultures de Colibacilles dans l'eau peptonée.

Nous voulons savoir, maintenant, si notre filtrat contient une seule souche de Bactériophage à virulences multiples ou bien deux souches différentes. Nous croyons pouvoir répondre à cette question par l'épreuve croisée. Nous possédons maintenant deux filtrats qui proviennent des passages successifs du Bactériophage sur le Bacille typhique d'une part, sur le Colibacille d'autre part. Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Bacille d'EBERTH et à l'un d'eux nous ajoutons le Bactériophage anticoli ; l'autre reste témoin. Deux autres tubes sont inoculés avec le Colibacille et à l'un d'eux nous ajoutons le Bactériophage antityphique, l'autre reste le tube témoin. Nous mettons les 4 tubes à l'étuve. Le lendemain nous constatons que le Bactériophage anticoli a empêché le développement du Bacille d'EBERTH, le Bactériophage antityphique, celui du colibacille et au même titre qu'ils ont empêché le développement du bacille de même nom.

Nous pouvons dire que le filtrat ne contient qu'une seule souche de Bactériophage, mais elle a une virulence égale pour le Bacille d'EBERTH et le Colibacille.

En résumé, nous avons trouvé le Bactériophage antityphique ou mieux, un Bactériophage virulent à la fois pour le Bacille d'EBERTH et le Colibacille dans l'eau d'égoût de la Ville de Paris et nous croyons être le premier à avoir découvert dans l'eau d'égoût le Bactériophage antityphique.

Nous mentionnons les travaux suivants qui se rapprochent des nôtres : JANET ANDERSON CALDWELL (1) dit que les eaux de rivières et de ports polluées par des eaux d'égoût contiennent toujours du Bactériophage actif vis-à-vis du Bacille typhique, du Colibacille et de beaucoup d'autres espèces microbiennes Gram négatives.

NAKASHIMA (2) a trouvé le Bactériophage virulent pour le Colibacille dans l'eau d'égoût de ville.

Recherche du Bactériophage antityphique chez un malade atteint d'endocardite streptococcique.

Le malade est en traitement depuis plusieurs semaines dans le service de M. le Professeur LEMIERRE à l'Hôpital Bichat. Nous allons rechercher le Bactériophage dans les selles de ce malade. Nous pratiquons un prélèvement et nous en ajoutons une

1. *Sevage filtrate as a source of Bacteriophage. Journ. Inf Dis.*, t. XL, mai 1927.

2. *Beitrag zum Vorkommen und Verhalten des bakteriophagen Lysins in Abwässern. Zentralblatt für Bakt.*, L, t. XCIV, 1925.

parcelle à un tube d'eau peptonée qui reste à l'étuve pendant 24 heures. La culture, très abondante, est filtrée d'abord sur terre d'infusoires, puis sur bougie CHAMBERLAND L 5. Le filtratensemencé sur eau peptonée est mis à l'étuve, mais le tube reste stérile.

L'épreuve de lyse bactérienne est faite à la fois sur le Bacille typhique et le Colibacille.

Une culture de Bacilles d'EBERTH de 24 heures est divisée en deux et l'un des tubes reçoit 15 gouttes de filtrat, l'autre tube reste témoin. Une culture de colibacilles de 24 heures est également divisée en deux et nous ajoutons du filtrat à l'un des tubes. Les 4 tubes sont mis à l'étuve. Le lendemain nous ne constatons pas de lyse.

Pour voir l'action empêchant du filtrat, nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Bacille typhique et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat. Nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Colibacille et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes de filtrat. Les 4 tubes sont mis à l'étuve. Les tubes témoins donnent des cultures normales. Mais le Bacille typhique n'a pas poussé dans le tube où nous avons ajouté du filtrat, le liquide reste presque limpide. Le tube de Colibacilles dans lequel nous avons ajouté également du filtrat, ne donne qu'un léger louche. Le filtrat contient donc un Bactériophage virulent pour le Bacille typhique et le Colibacille, mais beaucoup plus actif vis-à-vis du premier. Bien que ce soit le Bactériophage antityphique qui

nous intéresse en premier lieu, nous allons rechercher le Bactériophage anti-streptococcique, car notre malade présente une septicémie à streptocoques. M. le Professeur LEMIERRE nous donne l'hémoculture qui contient le microbe, mais nous ne parvenons pas à le repiquer. Nous avons plus de chance avec une nouvelle hémoculture. Nous n'escomptons pas de trouver un Bactériophage très virulent pour le streptocoque, aussi nous recherchons d'emblée l'action empêchante. Deux tubes de bouillon ascite sontensemencés avec le streptocoque et nous ajoutons à l'un des tubes du filtrat, puis les plaçons à l'étuve pour 24 heures. Le streptocoque pousse également dans les deux tubes. Pour plus de sûreté, nous coulons sur gélose le contenu des tubes. Le lendemain les tubes de gélose ne présentent aucune colonie et nous abandonnons cette recherche.

Le filtrat ne semble donc pas contenir de Bactériophage anti-streptococcique.

En résumé, nous avons trouvé un Bactériophage d'activité moyenne pour le Bacille d'EVERTH et un peu moins virulent pour le Colibacille chez un malade atteint d'endocardite à streptocoques. Cet homme n'a jamais eu la fièvre typhoïde.

**Recherche du Bactériophage antityphique
chez un malade présentant un état infectieux
non diagnostiqué.**

V... Charles, âgé de 33 ans, entre dans le service de M. le Professeur BEZANÇON à l'Hôpital Saint-Antoine au mois de mai 1931. Il a de la fièvre et quelques manifestations gastro-intestinales. On soupçonne chez lui la fièvre typhoïde et c'est la raison pour laquelle nous nous occupons de lui. Dans ses antécédents, nous notons le paludisme et la dysenterie amibienne. Il a été vacciné en 1917 contre la fièvre typhoïde. Au 8^e jour de sa maladie on fait une hémoculture qui reste négative. Le séro-diagnostic pratiqué le 12^e jour montre l'agglutination du Bacille d'EBERTH à 1/100.

Le 15^e jour de la maladie, nous faisons un prélèvement de selles pour la recherche du Bactériophage et l'identification du microbe pathogène.

Voyons d'abord ce dernier. Une parcelle de matière est délayée dans l'eau physiologique et nous ensemençons trois boîtes de Pétri contenant de la gélose lactosée tournesolée avec un fil de platine sans le recharger. Après 24 heures d'étuvation nous obtenons dans la première boîte de Pétri quelques colonies transparentes, bleuâtres, qui ne font pas virer le milieu tournesolé au rouge. Dans la seconde une colonie semblable, tandis que la troisième reste stérile.

Nous examinons une colonie au microscope à l'état frais : ce sont des bacilles immobiles. Ils ne prennent pas le Gram. Nous préparons le jeu de tubes suivant et les inoculons avec le bacille isolé :

- 1° Gélose inclinée ;
- 2° Gélose au plomb ;
- 3° Maltose tournesolé ;
- 4° Lactose tournesolé ;
- 5° Rouge neutre glucosé ;
- 6° Lait tournesolé.

Après 24 heures d'étuve nous obtenons les résultats suivants :

- 1° Culture abondante sur gélose inclinée ;
- 2° Le microbe ne noircit pas le plomb ;
- 3° Le maltose vire au rouge ;
- 4° Le lactose vire au rouge et devient opalescent ;
- 5° Le rouge neutre reste inaltéré ;
- 6° Le lait tournesolé vire au rouge.

M. PHILIBERT croit que le microbe que nous voulons identifier est probablement un *Proteus*. Nous ne poussons pas plus loin cette identification.

En même temps que nous voulions connaître le microbe, nous avons commencé la recherche du Bactériophage.

Une partie des matières est ajoutée à un tube d'eau peptonée et mise à l'étuve. Le lendemain, la

culture est filtrée sur terre d'infusoires, puis sur bougie CHAMBERLAND L5. En supposant la présence d'un Bactériophage de virulence moyenne pour le Bacille d'EBERTH et le Colibacille, nous pratiquons l'épreuve de l'action empêchante du filtrat sur les cultures des bacilles sus-indiqués.

Deux tubes d'eau peptonée sont inoculés avec le Bacille typhique et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes du filtrat.

De la même façon, nous inoculons deux tubes d'eau peptonée avec le Colibacille. L'un des tubes reçoit 15 gouttes du filtrat, l'autre reste témoin. Nous mettons les 4 tubes à l'étuve pour 24 heures. Passé ce temps, les 4 tubes montrent des cultures également abondantes. L'épreuve est négative, le filtrat ne contient pas de Bactériophage antityphique ou anticoli d'activité moyenne.

Pour nous assurer définitivement de l'absence du Bactériophage, nous coulons sur gélose inclinée le contenu des 4 tubes, puis les plaçons à l'étuve. Le lendemain nous trouvons des cultures absolument normales sur la gélose. Les matières de ce malade ne contiennent donc pas de Bactériophage.

Recherche du Bactériophage antityphique et anticoli chez un malade atteint de septicémie colibacillaire.

P... Jean entre dans le service de M. le professeur LEMIERRE au mois de mai 1931. L'hémoculture

pratiquée le 20 mai décele le Colibacille. Nous faisons un prélèvement de selles le 22 mai et l'ensemencions sur eau peptonée, puis nous mettons à l'étuve pendant 24 heures. Nous filtrons la culture sur terre d'infusoires, ensuite sur bougie CHAMBERLAND L 5. Pour s'assurer de sa stérilité, nous l'ensemencions sur bouillon, il ne donne pas de culture

Un Bactériophage de virulence moyenne est recherché par le phénomène d'empêchement. Deux tubes d'eau peptonée sont ensemencés avec le Bacille typhique et à l'un des tubes nous ajoutons 15 gouttes de filtrat. Deux autres tubes sont inoculés avec le colibacille du malade dont l'un reçoit 15 gouttes du filtrat. Les 4 tubes sont mis à l'étuve pour 24 heures. Ils donnent des cultures normales. Donc pas de Bactériophage de virulence moyenne.

Pour ne pas laisser passer un Bactériophage de faible virulence, nous étalons le contenu des tubes sur gélose inclinée que nous plaçons à l'étuve. Le lendemain les tubes de gélose montrent des cultures normales.

Nous pouvons en conclure que les selles de notre malade ne contiennent pas actuellement de Bactériophages antityphique ou anticoli.

CONCLUSIONS

Nous avons recherché le Bactériophage antityphique dans 6 cas différents : 3 fois dans la nature et 3 fois dans les selles de malades atteints d'autres affections que la fièvre typhoïde. Dans la nature nous avons examiné l'eau stagnante, la terre de jardin et l'eau d'égout. Nos malades présentaient respectivement : le premier une endocardite à streptocoques, le second un état infectieux non diagnostiqué, le troisième une septicémie à colibacilles.

Nous avons trouvé le Bactériophage antityphique dans deux cas sur six : dans l'eau d'égout et chez le malade atteint d'endocardite streptococcique. Ainsi, le Bactériophage antityphique doit être assez fréquent, plus fréquent en tous cas qu'on ne le dit.

Nous croyons avoir été le premier à le trouver dans l'eau d'égout. Nous avons recherché toujours le Bactériophage anticoli à côté du Bactériophage antityphique. Dans les deux cas où nous avons trouvé le Bactériophage antityphique, il était virulent pour le Colibacille aussi. Le Bactériophage isolé de l'eau d'égout était aussi actif pour le Colibacille que pour le Bacille d'EBERTH. Le Bactériophage isolé chez le

malade atteint d'endocardite à streptocoques avait une activité beaucoup moindre pour le Colibacille que pour le Bacille d'EBERTH.

Dans les autres cas il n'y avait pas de Bactériophage anticoli non plus.

En somme, nous n'avons pas atteint le but que nous nous sommes fixé : trouver un Bactériophage très virulent pour le Bacille d'EBERTH.

Nous espérons que nous pourrons reprendre un jour ces recherches, car nous croyons que la découverte d'un Bactériophage très actif vis-à-vis de toutes les souches de bacilles typhiques donnera la clef de la thérapeutique bactériophagique de la fièvre typhoïde.

Vu : le Président de thèse,
LEMIERRE.

Vu : le Doyen,
BALTHAZARD.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

1616. — Imp. de la Faculté de Méd., Jouve et Cie, 43, rue Racine. Paris. — 12-1931
